

# ラット40Sリボソームサブユニットから単離された 40kDaの蛋白質の構造決定とその性質

|     |   |
|-----|---|
| 著者  | 東郷 暁  |
| 号   | 1174  |
| 発行年 | 1993  |
| URL | <a href="http://hdl.handle.net/10097/20790">http://hdl.handle.net/10097/20790</a> |



## 論 文 内 容 要 旨

リボソームは蛋白合成において中心的な役割を演じている。従って、その構成成分の一次構造の解明は蛋白合成機構の理解に必須のものである。このような見地から原核生物（大腸菌）では全リボソーム蛋白質の一次構造が決定されている。しかしながら真核生物のリボソーム蛋白質では未だその全容は不明である。本研究ではラット 40 S リボソームの 40 kDa の蛋白質を精製し、その一次構造をアミノ酸配列と塩基配列から決定した。さらにその構造上の類似性からこの 40 kDa 蛋白質が真核生物リボソームにおける大腸菌リボソーム蛋白質 S2 に対応する構成成分であることを明らかにした。

1) ラット肝臓より 40 S サブユニットを蔗糖密度勾配遠心法で精製し SDS-PAGE で分析するとこれまで構造が明らかにされていない分子量 40,000 の蛋白質を他のリボソーム蛋白質から分離できることが明らかとなった。

2) そこで、この 40 kDa 蛋白質のバンドを SDS-PAGE のゲルから切り出し蛋白質をゲルから抽出して HPLC で精製した。精製蛋白質を Edman 法で解析した結果 N 端はブロックされていた。そこで精製蛋白質を lysyl endopeptidase で消化し HPLC で 7 種のペプチド断片を分離して、これらのペプチド断片より合計 109 残基のアミノ酸配列を決定した。決定したアミノ酸配列をもとにプライマーを設計し PCR 法で cDNA 断片を得た。この cDNA をプローブにしてラット肝臓 cDNA ライブラリーから 40 kDa 蛋白質の cDNA を cloning した。得られた cDNA は全長 1,018bp と polyA からなり、295 個のアミノ酸からなる分子量 32,823 の蛋白質をコードしていた。この蛋白質には先に決定した 7 種のペプチドのアミノ酸配列（109 残基）が全て含まれていた。精製蛋白質を塩酸加水分解して算出したアミノ酸組成は cDNA から推定された蛋白質のアミノ酸組成と良く一致した。またこの cDNA の試験管内転写翻訳産物はリボソームの 40 kDa 蛋白質と同一の位置に泳動された。以上より単離した cDNA はラット 40 S リボソームの 40 kDa 蛋白質をコードしていることが明らかとなった。

3) この cDNA をプローブとしてゲノミックサザンブロットを行ったところ、哺乳類（ラット、マウス、ハムスター）では多数のバンドが認められ、鳥類（ニワトリ）・両生類（アフリカツメガエル）では 2-3 本のバンドが認められた。この結果から 40 kDa 蛋白質の遺伝子は哺乳類では多重遺伝子ファミリーを形成しており鳥類・両生類では 2-3 コピーの遺伝子からなると考えられた。この cDNA をプローブとしたノーザンブロットでは、1.3kb の単一のバンドがラットのいずれの臓器でも認められ、この遺伝子が ubiquitous に発現していることが考えられた。以上のような遺伝子の構成と発現パターンはリボソーム蛋白質のような house keeping gene の

特徴とよく一致していた。

4) 40 kDa リボソーム蛋白質の一次構造を既知のリボソーム蛋白質と比較した結果、40 kDa 蛋白質は真性細菌（大腸菌，スピルリナ）と葉緑体（トウモロコシ，タバコ）などの原核生物のリボソーム蛋白質 S2 と29-37%の相同性を有していた。従って，この40 kDa 蛋白質は原核生物リボソーム蛋白質 S2 の counterpart と考えられた。

5) 40 kDa リボソーム蛋白質の一次構造を既知の塩基配列（EMBL database）と比較した結果，ラット 40 kDa リボソーム蛋白質はヒト，マウス，ウシ，ヒドラ，ショウジョウバエの cDNA で 68 kDa laminin binding protein の cDNA とされてきたものと塩基配列で52-95%，コードするアミノ酸配列で57-99%の相同性が認められた。従って40 kDa リボソーム蛋白質と cDNA から推定された 68 kDa laminin binding protein は各々の種の counterpart と考えられた。

6) 上記 cDNA（68 kDa laminin binding protein の cDNA）は細胞表面に存在する 68 kDa ラミニン結合蛋白質に対するモノクローナル抗体を用いて単離されてきたものである。しかし cDNA がコードする蛋白質は(a)分子量が68,000ではなく33,000であり，(b)疎水度解析の結果，シグナル配列や膜貫通領域が認められない。さらに(c)ラット，ヒト，マウス，ウシ，ヒドラ，ショウジョウバエ蛋白質のアミノ酸配列を比較すると，ヒト蛋白質において laminin 結合領域と報告されてきた領域はヒドラ，ショウジョウバエでは保存されていなかった。従って，この 68 kDa laminin binding protein cDNA と報告されてきた cDNA が細胞表面に存在する 68 kDa laminin binding protein をコードすることには矛盾が多いと考えられた。

以上，本研究で今まで構造が不明であった真核生物 40 kDa リボソーム蛋白質の一次構造が初めて明らかとなり，この蛋白質は原核生物のリボソーム蛋白質 S2 の counterpart であることが考えられた。またヒト，マウスなどで 68 kDa laminin binding protein の cDNA として報告されてきたものは細胞表面に実在する蛋白質をコードしているのではなく本研究で一次構造が明らかとなった 40 kDa リボソーム蛋白質をコードしていることが明らかとなった。

## 審 査 結 果 の 要 旨

リボソームは蛋白合成において中心的な役割を演じている。本研究ではラット 40S リボソームの 40kDa の蛋白質を精製し、その一次構造をアミノ酸配列と塩基配列から初めて決定した。

1) ラット肝臓より 40S サブユニットを蔗糖密度勾配遠心法で精製し SDS-PAGE で分析した結果、これまで構造が明らかにされていない分子量 40,000 の蛋白質を他のリボソーム蛋白質から分離できることが明らかとなった。

2) この 40kDa 蛋白質を精製し Edman 法で解析した結果、N 端はブロックされていた。そこで精製蛋白質を lysyl endopeptidase で消化し HPLC で 7 種のペプチド断片を分離して、これらのペプチド断片より合計 109 残基のアミノ酸配列を決定した。決定したアミノ酸配列をもとにプライマーを設計しラット肝臓 cDNA ライブラリーから、この蛋白質をコードしていると考えられる cDNA を cloning した。得られた cDNA は全長 1,018bp と polyA からなり、295 個のアミノ酸からなる分子量 32,823 の蛋白質をコードしていた。この蛋白質には先に決定した 7 種のペプチドのアミノ酸配列 (109 残基) が全て含まれていた。またこの cDNA の試験管内転写翻訳産物はリボソームの 40kDa 蛋白質と同一の位置に泳動された。以上より単離した cDNA はラット 40S リボソームの 40kDa 蛋白質をコードしていることが明らかとなった。

3) 40kDa リボソーム蛋白質の一次構造を既知のリボソーム蛋白質と比較した結果、40kDa 蛋白質は真性細菌 (大腸菌, スピルリナ) と葉緑体 (トウモロコシ, タバコ) などの原核生物のリボソーム蛋白質 S2 と 29-37% の相同性を有していた。

4) 40kDa リボソーム蛋白質の一次構造とその cDNA を既知のアミノ酸・塩基配列 (EMBL database) と比較した結果、ラット 40kDa リボソーム蛋白質はヒト, マウス, ウシ, ヒドラ, ショウジョウバエで 68kDa laminin binding protein の cDNA とされてきたものと塩基配列で 52-95%, コードするアミノ酸配列で 57-99% の相同性が認められた。

5) 上記 cDNA がコードする蛋白質は (a) 分子量が 68,000 ではなく 33,000 であり, (b) 疎水度解析の結果, シグナル配列や膜貫通領域が認められない。従って, この 68kDa laminin binding protein cDNA と報告されてきた cDNA が細胞表面に存在する 68kDa laminin binding protein をコードすることには矛盾が多いと考えられた。

以上, 本研究で今まで構造が不明であった真核生物 40kDa リボソーム蛋白質の一次構造が初めて明らかとなり, この蛋白質は原核生物のリボソーム蛋白質 S2 の counterpart であることが考えられた。またヒト, マウスなどで 68kDa laminin binding protein の cDNA として報告されてきたものは細胞表面に実在する蛋白質をコードしているのではなく本研究で一次構造が明らかとなった 40kDa リボソーム蛋白質をコードしていることが明らかとなった。

このように本研究により得られた知見は医学・生物学上極めて重要であり, 本論文は学位論文に値するものと考えられる。